

發明名稱：整合型微流體電噴灑晶片系統及其分析方法

專利申請人：國立成功大學

發明人：陳淑慧、宋旺洲、廖寶琦、李國賓

【摘要】

本發明係有關於一種整合型微流體電噴灑晶片系統及其分析方法，係整合水解酵素反應、固相萃取機制、電泳分離模式與質譜偵測於系統中，先將樣品水解及去鹽濃縮之後再導入微流體電噴灑晶片中進行電泳分離，最後將分離後之樣品以電噴灑方式導入質譜儀中，進行連續快速之線上即時偵測及鑑定，主要係可應用於生化物質（如：蛋白質）之鑑定。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種建立快速鑑定蛋白質的整合型微流體電噴灑晶片系統及其分析方法，主要是將傳統的蛋白質水解反應加以改進，再結合固相萃取機制、電泳晶片及質譜鑑定模式成為一個整合的系統，發展出能對蛋白質鑑定過程一貫化及高準確性之研究。

【先前技術】

毛細管電泳（Capillary electrophoresis, CE）自發展以來，以其快速的分離時間、微量的樣品注射體積、高靈敏度以及儀器操作的便利性等優越條件，已廣泛的應用在各種分析領域 [R. Kuhn, S. Hof. Kuhn, *Capillary Electrophoresis : Principles and Practice*, 1993, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg N.Y.(U.S.A.)]，尤其近幾年來生物科技的快速發展，毛細管電泳所發展出來的分析技術，更是大量應用在以去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid, DNA）分析為基礎的研究 [Roche, M.E.; Oda, R.P.; Landers, J.P. *BIOTECHNOLOGY PROGRESS*, 1997, 13, 659-668]。隨著生化科技及半導體製程技術的進步，1992 年 Manz 將毛細管電泳微小化應用於微晶片上進行樣品分離之實驗 [Manz, A.; Harrison, D.J.; Verpoorte, E.M.J.; Fettingner, J.C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H.M.J. *Chromatogr.* 1992, 593, 253-258]，因此將傳統之毛細管電泳技術推進到另一層更高科技之領域 - 晶

片式電泳。

晶片式電泳對於微量物種的分析具有高效率的分析方法 [K. Seiler, D.Jed Harrison, A. Manz. *Analytical Chemistry* 65(1993), 1481], 例如：將純化過的樣品（如：經過聚合 鍊反應(polymerase chain reaction, PCR)放大後的去氧核糖核酸(DNA)產物、酵素和受質、抗體和抗原）置於晶片樣品槽內進行分析等相關之報導 [N.-H. Chiem, D.J. Harrison. *Electrophoresis* 19 (1998), 3040]; [N.-H. Chiem, D.J. Harrison. *Clinical Chemistry* 44(3)591]。

蛋白質鑑定(Protein Identification)對於藥物開發與分析，病人檢體的篩檢等運用相當廣泛。此種分析最主要的目的是對未知蛋白質做一辨識的動作，如平板膠電泳可將數千個蛋白質進行非常好的分離，但卻無法對分離出的訊號鑑定其所屬的蛋白質為何。而蛋白質的鑑定方法就是利用水解酵素將膠體內的蛋白質進行水解，使其分裂出很多特定的胜 (peptide)小分子，再利用質量分析儀進行二次質譜來偵測出胜 中氨基酸種類及排列順序，最後與蛋白質資料庫進行資料比對，以鑑定出蛋白質的種類及來源。

進行蛋白質鑑定的過程時，第一個步驟是進行蛋白質水解，傳統的方法是將蛋白質水溶液中加入水解酵素 (Trypsin)進行水解反應，於 37℃下經過 8 至 24 小時始可得到蛋白質的水解產物。此實驗中，利用固定化的水解酵素與蛋白質來進行反應，藉由簡單之沖洗動作即能將水解

的蛋白質與水解酵素分離，其特徵係能使水解的產物中不含水解酵素，以增加後面進行蛋白質鑑定的準確性。

經過水解反應之後的蛋白質，需去除水解緩衝溶液中的鹽份才能進入質譜進行分析，通常可經由高效能液相層析質譜儀進行分離與質譜偵測，但所需分析時間過長且樣品注射一次之後，無法進行連續多次分析，如此會增加樣品消耗量及降低分析的準確性。

【發明內容】

有鑑於習知技術對於蛋白質分析上之缺陷及弊端，本發明係提供一種整合型微流體電噴灑晶片系統，係整合水解酵素反應，固相萃取機制，電泳分離模式與質譜偵測於系統中以鑑定蛋白質。

本發明之整合型微流體電噴灑晶片系統，至少包含：一微流體晶片，其上具有複數個微管道作為樣品分離之用；一電噴灑噴嘴，係連接於前述晶片上作為樣品離子化之用；一水解單元，係作為樣品水解反應之用；一固相萃取單元，係作為樣品濃縮、純化之用；一質譜儀，作為分析及/或鑑定樣品之用；及一電源供應器，係作為提供系統電壓以進行電泳分離及電噴灑離子化之用。

前述之微流體晶片，其上具有複數個微管道及液體儲存槽以供樣品進樣、分離之用；前述晶片之材質可為石英、玻璃、矽晶片、高分子塑膠材料或其他具有相同功效之材質。

前述電噴灑噴嘴係連接於微流體晶片中樣品分離後所送出之液體儲存槽之末端，藉此將分離後之樣品經由電噴灑噴嘴離子化後送入質譜儀分析。

前述水解單元係由一卡匣填充水解酵素，係用於水解蛋白質樣品之用。

前述固相萃取單元係可依樣品之特性填充適合之固相，如液相層析儀之各種靜相使樣品進行萃取後再沖提至晶片上進行分離，最後進入質譜儀進行即時偵測。固相萃取單元係可連結於注射器上或設置於注射器之前。

本發明之另一目的係提供一種利用微流體電噴灑晶片系統快速鑑定蛋白質之方法，至少包含下列步驟：將樣品導入水解單元以進行水解反應；之後將樣品再導入固相萃取單元以進行固相萃取反應；將經水解及固相萃取後之樣品導入微流體晶片中進行電泳分離；將分離後之樣品經電噴灑噴嘴噴出以離子化樣品；及將離子化後之樣品導入質譜儀中進行即時分析及鑑定。

使用本發明之整合型系統鑑定蛋白質，相較於傳統鑑定法具有諸多優點：1.蛋白質水解時間：傳統鑑定法需耗時 2~16 小時，本發明之方法只需 10~20 分鐘；2.樣品可分析次數：傳統鑑定法每注射一次樣品，只能做一次分析（signal analysis），而本發明之方法一次的樣品注射量及可達到多次分析（multianalysis），例如：每次 20 μ L 樣品注射量可重複分析六次；3.分離方法：傳統鑑定法係以

層析法 (chromatography) 將樣品分離，平均分析一次約需 20~60 分鐘，本發明之方法則使用電泳分離 (electrophoresis)，平均分析一次之時間只需 3 分鐘；4. 電噴灑離子化方式 (electrospray)：傳統方法之電噴灑離子化方式需藉由邊鞘流 (sheath gas 及 flow) 達成，而本發明之方法無須此裝備即可藉由電噴灑噴嘴將樣品離子化；5. 完整之蛋白質鑑定時程：傳統鑑定法完成蛋白質鑑定需花費 4~24 小時，本發明之方法樣品一分離出來後則可立即導入質譜儀中進行線上即時偵測，可大幅縮短分析時間。

【實施方式】

如第一圖所示，本發明之整合型微流體電噴灑晶片系統 100，至少包含：一微流體晶片 1，其上具有複數個微管道 11 以用於樣品分離之用；一電噴灑噴嘴 2，係連接於前述晶片 1 上以作為樣品離子化之用；一水解單元 3，係作為樣品水解反應之用；一固相萃取單元 4，係作為樣品濃縮、純化之用；一質譜儀 5，用以分析及/或鑑定樣品之用；及一電源供應器 6，係作為提供系統電壓以進行電泳分離及電噴灑離子化之用。前述質譜儀 5 測得之訊號係透過訊號處理單元 7 輸出。

前述之微流體晶片 1，其上具有複數個微管道 11 及液體儲存槽 12，以供樣品進樣、分離之用。前述晶片 1 之

材質可為石英、玻璃、矽晶片、高分子塑膠材料或其他具有相同功效之材質。

前述電噴灑噴嘴 2 係連接於微流體晶片 1 中樣品分離後所送出之液體儲存槽 12 之末端，藉此將分離後之樣品經由電噴灑噴嘴 2 離子化後送入質譜儀 5 分析。電噴灑噴嘴 2 之材質係可使用熔融矽材質之毛細管製成。

前述水解單元 3 係由一卡匣填充水解酵素，例如：胰蛋白（trypsin）所製成，係用於水解蛋白質樣品之用。

前述固相萃取單元 4 係可依樣品之特性填充適合之固相，如液相層析儀之各種靜相，例如：碳十八小珠、Oligo R3 小珠以使樣品進行去鹽後再沖提至晶片 1 上進行分離及電噴灑，再由質譜儀 5 進行即時偵測。該固相萃取單元 4 係可連結於注射器 9 上，以分批注射不同樣品。

本發明之另一目的係提供一種利用微流體電噴灑晶片系統快速鑑定蛋白質之方法，請參第一圖，首先，將蛋白質樣品藉由自動進樣裝置 8（例如：幫浦）導入水解單元 3，以進行水解反應；之後將蛋白質導入固相萃取單元 4，以進行固相萃取反應；接下來，將經水解及固相萃取後之蛋白質導入微流體晶片 1 上之微管道 11 中，配合電源供應器 6 提供適當之驅動電壓以進行電泳分離；將分離後之蛋白質經電噴灑噴嘴 2 噴灑以離子化蛋白質；之後，

將離子化後之蛋白質導入質譜儀 5 中進行即時分析及鑑定；最後，經由訊號處理單元 7 將質譜儀 5 測得之訊號輸出。

本發明之整合型微流體電噴灑晶片系統及其分析方法，將透過下述實施例做更進一步說明。

實施例

實驗裝置：

本實施例係使用如第二圖所示之系統（其裝置設置之結構如第一圖所示），圖中之自動進樣裝置 1 係為兩台幫浦 10；水解單元 3 係以一卡匣填充胰蛋白作為水解酵素 (Trypsin Immobilize bead, Particle size=40 um, Pierce 20230)；固相萃取單元 4 係為一連結於注射器 9 之迴圈 (loop)，其中係填充液相層析之 Oligo R3 小珠 (Oligo R3 bead, Particle size=20 μ m, Applied Biosystem 1-1339-03)。本實施例係使用兩種不同的蛋白質樣品 (α -Lactalbumin 及 β -Casein) 進行偵測。

操作方式：

首先，將 α -Lactalbumin 及 β -Casein 兩種蛋白質樣品藉由幫浦 10 分批導入水解單元 3 中，水解蛋白質後產生之胜 再經由注射器 9 導入固相萃取單元 4 (即迴圈) 中，胜 之疏水性區域會與 Oligo R3 之疏水基作用，使胜 吸附於 Oligo R3 小珠上，利用低比例之有機溶劑進行清洗 (wash)，將鹽類 (salt) 移除，接著提高有機溶劑比例，

進行沖堤(elution)使胜 由 Oligo R3 小珠脫附，在這清洗與沖堤動作之間，胜 在注射器迴圈中有固相萃取(solid phase extraction)的效應，具有去鹽(desalting)及純化(purification)的功能。接著將樣品導入微流體電噴灑晶片 1 中進行電泳分離，分離之後的樣品則依序進入電噴灑噴頭 2 進行游離化，形成帶正電荷的離子，最後進入質譜儀 5 進行偵測及分析。

分析結果：

經前述操作過程後，其分析結果如第三圖及第四圖所示。其中第三(a)圖係將兩種不同的蛋白質(α -Lactalbumin 及 β -Casein)連續分批注入系統分析後之質譜圖。以 α -Lactalbumin 為例，單一次注射之量可以連續分析 6 次，因此非常適合用於微量分析。

第三(b)圖係選擇 α -Lactalbumin 中特定分子量(m/z 600.8)的胜 所得到的質譜圖。圖中顯示，當選擇 α -Lactalbumin 特有之分子量時，質譜圖中並未出現 β -Casein 之訊號。同樣地，第三(c)圖係選擇 β -Casein 中特定分子量(m/z 748.3)的胜 所得到的質譜圖。圖中顯示，當選擇 β -Casein 特有之分子量時，質譜圖中並未出現 α -Lactalbumin 之訊號。由此證明，本系統即使連續注射不同之樣品，各樣品訊號之間不會產生干擾或殘留之現象。

此外，本發明之系統除可將樣品進行電泳分離外，並可針對樣品之分離圖譜，取其不同時間點偵測其質譜圖。

如第四圖所示，以 β -Casein 為例，第四(a)圖係偵測第三(a)圖於 94.09 分鐘時分離出來之 β -Casein 之胜 片段得到之質譜圖、第四(b)圖則是 94.94 分鐘、第四(c)圖為 95.50 分鐘之質譜圖。由第四圖之結果發現不同分子量之胜 可利用電泳進行分離，並進一步由質譜移進行偵測以增加蛋白質鑑定之準確性。

當然，本發明之實施範圍只要不脫離本發明之要旨，可進行種種之變更，其保護範圍由以下之申請專利範圍所界定。

【圖式簡單說明】

第一圖係本發明之整合型微流體電噴灑晶片系統之裝置示意圖。

第二圖係本發明之實施例使用之整合型微流體電噴灑晶片系統之裝置示意圖。

第三(a)圖係利用本發明之系統將蛋白質 α -Lactalbumin 及 β -Casein 進行連續分析所得到的全質譜圖。

第三(b)圖係選擇 α -Lactalbumin 中特定分子量(m/z 600.8)的峰 所得到的質譜圖。

第三(c)圖係選擇 β -Casein 中特定分子量(m/z 748.3)的峰 所得到的質譜圖。

第四(a)圖係偵測第三(a)圖於 94.09 分鐘時分離出來之 β -Casein 之峰 片段得到之質譜圖。

第四(b)圖係偵測第三(a)圖於 94.94 分鐘時分離出來之 β -Casein 之峰 片段得到之質譜圖。

第四(c)圖係偵測第三(a)圖於 95.50 分鐘時分離出來之 β -Casein 之峰 片段得到之質譜圖。

【主要元件符號對照說明】

1---微流體晶片

2---電噴灑噴嘴

3---水解單元

4---固相萃取單元

- 5---質譜儀
- 6---電源供應器
- 7---訊號處理單元
- 8---自動進樣裝置
- 9---注射器
- 10---幫浦
- 11---微管道
- 12---液體儲存槽
- 100---整合型微流體電噴灑晶片系統

【申請專利範圍】

1. 一種整合型微流體電噴灑晶片系統，至少包含：

一微流體晶片，其上具有複數個微管道作為樣品分離之用；

一電噴灑噴嘴，係連接於前述晶片上作為樣品離子化之用；

一水解單元，係作為樣品水解反應之用；

一固相萃取單元，係作為樣品濃縮、純化之用；

一質譜儀，作為分析及/或鑑定樣品之用；及

一電源供應器，係作為提供系統電壓以進行電泳分離及電噴灑離子化之用。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之微流體晶片，其上具有複數個微管道及液體儲存槽以供樣品進樣、分離之用。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述晶片之材質可為石英、玻璃、矽晶片、高分子塑膠材料或其他具有相同功效之材質。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之電噴灑噴嘴係連接於微流體晶片中，樣品分離後所送出之液體儲存槽之末端。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之水解單元係由一卡匣填充水解酵素所構成。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之水解酵素係可為胰蛋白。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之固相萃取單元係可填充 Oligo R3 小珠或碳十八小珠或任何可應用於液相層析之靜相。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之固相萃取單元係可由一填充靜相之迴圈所構成。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之迴圈係可連接於注射器上。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其中前述之電噴灑噴嘴之材質係可使用熔融矽材質之毛細管製成。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述之整合型微流體電噴灑晶片系統，其係整合水解酵素反應、固相萃取機制、電泳分離模式與質譜偵測於系統中以鑑定蛋白質。
12. 一種利用整合型微流體電噴灑晶片系統快速鑑定蛋白質之方法，至少包含下列步驟：
 - 將樣品導入水解單元以進行水解反應；
 - 將樣品導入固相萃取單元以進行固相萃取反應；
 - 將經水解及固相萃取後之樣品導入微流體晶片中進行電泳分離；
 - 將分離後之樣品經電噴灑噴嘴噴出以離子化樣品；

及

將離子化後之樣品導入質譜儀中進行分析及鑑定。

- 13.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述之微流體晶片，其上具有複數個微管道及液體儲存槽以供樣品進樣、分離之用。
- 14.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述晶片之材質可為石英、玻璃、矽晶片、高分子塑膠材料或其他具有相同功效之材質。
- 15.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述之電噴灑噴嘴係連接於微流體晶片中，樣品分離後所送出之液體儲存槽之末端。
- 16.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述之水解單元係由一卡匣填充水解酵素所構成。
- 17.如申請專利範圍第 16 項所述之方法，其中前述之水解酵素係可為胰蛋白。
- 18.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述之固相萃取單元係可填充 Oligo R3 小珠或碳十八小珠或任何可應用於液相層析之靜相。
- 19.如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中前述之固相萃取單元係可由一填充靜相之迴圈所構成。

15.